

ハロセンのラット分離肝細胞に対する影響 : GOTの逸脱を指標とした免疫組織化学的研究

著者	絹川 裕史
発行年	1990-06-28
URL	http://hdl.handle.net/10422/1790

氏名・（本籍） 絹 川 裕 史（大阪府）
学 位 の 種 類 医学博士
学 位 記 番 号 論医博第63号
学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当
学位授与年月日 平成2年6月28日
学位論文題目 ハロセンのラット分離肝細胞に対する影響
-GOTの逸脱を指標とした免疫組織化学的研究
I. 光学顕微鏡の解析 II. 電子顕微鏡の解析

審 査 委 員	主査 教授	服 部 隆 則
	副査 教授	前 田 敏 博
	副査 教授	天 方 義 邦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

ハロセンによる肝障害の問題を解明することを目的とし、ハロセンの肝組織に対する影響をラット分離肝細胞を用いて GOT の細胞外逸脱を指標に免疫組織化学的に検討した。

〔方 法〕

タンパク分解酵素灌流法により、8～10週令の Wistar 系雄性ラットから分離肝細胞を得た。細胞数を20万個/mlに調整し、0.5%, 0.75%, 1%, 2%, 3%, 5%の血中濃度に相当するハロセンを添加した。さらに液相のハロセン濃度がそれぞれの血中濃度に相当し、また酸素張力が低酸素状態でないことを確認してから分離肝細胞浮遊液を37℃で30分間振盪した。そして直ちに分離肝細胞を4%パラフォルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド、0.2%ピクリン酸で固定、寒天に包埋、クリオスタットあるいはビブラトーム切片とし、ミトコンドリア型(m)または細胞質型(s)-GOT抗血清を用いて免疫組織化学的染色を施した。染色強度の解析にはm-GOTに関しては画像解析を、s-GOTに関しては顕微測光を行った。また免疫染色の後、電子顕微鏡標本作製して微細構造との関係を解析した。

〔結 果〕

分離肝細胞における2種類のGOTアイソザイムの免疫陽性度と微細構造は、ハロセンの濃

度が0.75%濃度（1 MAC相当）以下の低濃度と1%濃度以上の高濃度では大きな違いがみられた。対照群の m-GOT 免疫反応産物はミトコンドリアに局限しており、細胞によって質的、量的な違いがみられた。また、陽性細胞には大型のミトコンドリアを有するものと小型のミトコンドリアを有するものの2種類があり、前者がほとんど全てのミトコンドリアに免疫反応産物を認めたのに対し、後者は陽性と陰性のミトコンドリアが混在していた。低濃度ハロセンですでに大型および小型ミトコンドリアともに酵素逸脱が生じ、強陽性細胞は著明に減少した。ミトコンドリアは種々の形態変化を示したが、これらの形態変化と酵素逸脱の程度は完全には一致しなかった。また、その反面で弱陽性細胞が著しく増加したが、陰性細胞は増加しなかった。高濃度ハロセンでは大型および小型ミトコンドリアとも全体に酵素逸脱が激しくなるとともにミトコンドリアの形態変化も著しくなった。1%から3%濃度ではミトコンドリア膜の剥離や基質密度の上昇などの変化がみられ、強陽性細胞が著明に減少し、陰性細胞がゆるやかに増加した。5%濃度ではミトコンドリアの変化が極度に強くなり、陰性細胞が6割以上を占めた。対照群の s-GOT 免疫反応産物はほとんど全ての細胞にみられたが、細胞質における分布は様ではなかった。低濃度ハロセンですでに細胞質から多くの酵素逸脱を認めた。すなわち強陽性細胞が8割以上減少し、中陽性細胞が半減したのに対し、弱陽性細胞は著しく増加した。しかし陰性細胞にはあまり変化がなかった。この時の細胞質の変化として粗面および滑面小胞体の拡大を認めた。高濃度ハロセンでは強陽性細胞は消失し、陰性細胞が著明に増加した。

〔考 察〕

本研究の結果は、ハロセン添加による両 GOT のアイソザイムの逸脱が1MACを境界として低濃度と高濃度とでは大きな違いがあることを示している。すなわち低濃度ハロセンですでに酵素逸脱を開始するが、それは強陽性細胞に著しく陰性細胞がほとんど増加しないことを特徴としたのに対し、高濃度ハロセンでは強陽性細胞の消滅と弱陽性および陰性細胞の増加を特徴とした。つまり両アイソザイムとも強陽性細胞はハロセンに対して非常に感受性が高く弱陽性細胞は低かった。このことは酵素保有量の多い生物活性の旺盛な細胞の方が生物活性の低下した細胞よりも傷害を受けやすく、また一度傷害を受けると早期に酵素を逸脱させて生物活性を低下させるが、その後は傷害が大きくなってもある程度まで生物活性を維持し続けることを示唆するものである。分離肝細胞の GOT アイソザイム含有量やハロセン感受性が細胞によって異なるとする本研究の結果は、生理的肝組織における薬物反応の一面を示唆するものと思われる。m-,s-GOTの両酵素が薬物に対する易傷害性に違いがみられる理由として、両酵素の細胞内における存在部位の違いがあげられる。すなわち、s-GOTは細胞質に存在しているため、細胞膜が傷害を受けてその機能が低下すると容易に細胞外へ逸脱するのにに対し、m-GOTはミトコンドリア内のクリステに存在するため細胞膜やミトコンドリア膜の傷害だけでは容易に逸脱せず、ミトコンドリアの内部構造が傷害を受けることによって逸脱するものと思われる。

〔結 論〕

1. 分離肝細胞に対するハロセンの影響は低濃度〔0.75%濃度（1MAC 相当）以下〕ですでにみられた。
2. 1MACを境界として低濃度と高濃度では傷害の質および量ともに大きな違いがみられた。
3. ハロセンに対する易傷害性は細胞、ミトコンドリア、アイソザイムにより異なった。

学 位 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

現在の代表的な吸入麻酔薬であるハロセンの最も重大な副作用に肝障害がある。この原因には、ハロセンの肝細胞に対する直接作用とその代謝産物や過敏反応などを含めた間接作用による影響が考えられているが、現在までにこの直接作用を調べた研究は非常に少ない。本研究は、ハロセンの肝組織に及ぼす直接作用を、*in vitro*の肝実質細胞系を用いて、GOTの細胞外逸脱を指標として免疫組織化学的に調べたものである。

著者は、ラット分離肝細胞に、1MAC（0.75%濃度）を中心として、0.5%から5.0%までの血中濃度（0.75%以下を低濃度、1.0%以上を高濃度と定めた）に相当するハロセンを添加し、ミトコンドリア型（m⁻）と細胞質型（s⁻）のGOTの逸脱過程を、それぞれのGOTの抗血清を用いた免疫組織化学的方法で、光学顕微鏡と電子顕微鏡で検討し、以下の所見を得た。

- 1) m⁻GOTとs⁻GOTに対する分離肝細胞の免疫陽性度は様々で、肝細胞に多様性がみられた。
- 2) 分離肝細胞にハロセンを添加した場合、低濃度であっても、m⁻GOTとs⁻GOTに酵素逸脱が生じ、特にs⁻GOTで著明であった。
- 3) ハロセンの高濃度の添加では、m⁻GOTとs⁻GOTの逸脱量が多くなり、細胞傷害も強くなった。
- 4) ハロセンに対する易傷害性は細胞により異なり、同一細胞内でもミトコンドリアにより異なり、また、m⁻GOTとs⁻GOTの逸脱程度は同一種類の細胞内でも異なっていた。

以上のことより、従来より均一な肝実質細胞集団と思われていた分離肝細胞系が、GOTの免疫組織化学的染色により、酵素的にかなり多様性のある細胞集団であることが判明した。また、ハロセンが低濃度であっても肝細胞に形態変化を伴った酵素逸脱が生じうることが示され、臨床使用濃度、それも比較的低濃度でも肝障害が発生する可能性が十分にあることが示唆された。

本研究は、ハロセンの肝細胞に対する傷害性を酵素逸脱と形態変化とから検討し、ハロセンによる肝障害問題を解明する重要な所見を提供したもので、医学博士の学位論文として価値あるものと認められる。